Taqman 多重实时荧光 PCR 同步定量检测六种动物源性成分方法的建立*

付理文[1] 张宇[2] 依含[2] 李雪[3] 朱乃硕**

(复旦大学 生命科学学院遗传工程国家重点实验室 生物医学研究院 微生物与分子免疫学研究室 上海 200438)

摘要：旨在建立一种可同时检测猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅六种动物源性成分的六重荧光定量 PCR 方法。根据猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅细胞核基因组保守序列，参照序列比对结果选择差异位点设计 6 对特异性引物和 6 条以不同荧光素标记的 Taqman 探针。通过对 PCR 反应体系和反应条件的优化筛选，建立能同步定量检测猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅源性成分的六重实时荧光定量 PCR 方法。应用此方法分别对 18 种不同源性动物 DNA 和 200 份不同来源样品进行猪牛羊鸡鸭鹅源性成分检测，结果表明，所建立的六重荧光定量 PCR 方法灵敏度高，对六种动物的最低核酸检测量分别为 0.049ng、0.048ng、0.085ng、0.13ng、0.162ng、0.074ng（50μl 体系）；特异性强，对狗、兔、鼠、驴、马、骆驼等其他 12 种动物无特异性扩增；200 份样品的检测结果表明六重 qPCR 检测方法敏感，同一反应体系下实现一次对 6 种动物快速定量检测，耗时短、效率高、适用性广，可用于肉品、奶品、皮毛和饲料等动物产品猪牛羊鸡鸭鹅源性成分单一或混合物种的鉴别诊断。

关键词：核基因组保守序列，六重实时荧光定量 PCR，猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅源性成分

---

* 国家科技重大专项(2012ZX10002006-002-003)、国家自然科学基金(30571650，31370927)、国家“863”生物医药高技术课题(2011AA02A114)、上海市科委科学基金(13431900602)资助项目

**通讯作者，电子信箱：nzhu@fudan.edu.cn

当前，食品领域掺假现象尤其是动物肉类掺假十分严重，不仅损害了消费者的利益，也给食品安全带来了潜在风险。传统依靠感官与经验的肉类形态学鉴别手段已远不能满足对肉制品掺假监控的需要。猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅等肉类基本囊括了目前市场 80%的禽畜食用肉类，由于价格差异较大，一些不法分子为牟取暴利大肆掺杂使假，损害禽畜产品质量；除此以外，其他掺假的肉类也种类繁多，如马肉[1]、驴肉[2]、狐狸肉[3]、骆驼肉、甚至有在老鼠肉中加入明胶、胭脂红、硝盐等以此冒充羊肉售予顾客[4]。随着现今科技含量的日益提高，造假手段也不断翻新，监管部门虽然掌握着一定的鉴定技术，但这些技术主要是对单一物种的检测鉴定，或对常见少数物种的定性鉴定，不能做到定量检测，更无法得知掺假肉品中各成分所占的比例。因此，开发出一种多物种基因快速同步定量检测方法是当前国家市场监督、肉类食品产供销企业和广大消费者对食品安全保证及质量控制的迫切需要。

目前，基于 PCR 的肉类食品鉴定方法在国内外已有不少报道。例如，Dooley 等[1]基于线粒体*细胞色素 b* 基因，分别建立了牛肉、猪肉、羊肉、鸡肉和火鸡肉的实时荧光定量 PCR 检测方法；曾少灵等[2]根据动物线粒体*细胞色素 b* 基因的差异性位点设计特异性引物和不同荧光素标记的 Taqman 探针，建立用于牛、山羊和绵羊源性成分 DNA 快速检测的方法等。这些检测方法大多建立在以线粒体基因为检测对象的基础上，在理论上只能用于定性鉴别基因的种属来源，不能真正检测出各肉类成分量的比重。而且，以线粒体作为检测对象并不能真正地反映细胞数目，因为不同细胞内所含线粒体的数目不尽相同，除此之外，线粒体的分解也使得检测结果变得不可靠。

本室以细胞核基因组 DNA 为分子靶标进行定量检测。由于基因组 DNA 在动物体细胞核内拷贝数确定（通常为两份拷贝），所以通过对基因拷贝数的测定可以直接推算出细胞数目，实现肉类成分的绝对定量，真实地反映不同成分肉类所占的比例。而且，基因组 DNA 序列相对保守，物种品系覆盖度广，使检测方法有更好的灵活性、适应性和稳定性。本研究选取了猪牛鸡鸭鹅的保守基因 *actb* 及羊 *prolactin receptor* 基因，通过全局比对针对基因序列的差异位点分别设计了猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅的引物与探针，并分别以 Cy5、HEX、FAM、Cyan500、ROX 和 Red640 荧光素进行标记，第一次成功建立了能在同一管中同时检测出猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅源性成分的六重实时荧光定量 PCR 方法，灵敏度高、特异性强、重复性好、高效快速，适用于肉品、奶品、生皮和动物饲料油脂等动物产品中猪牛羊鸡鸭鹅源性成分的鉴定。

1 材料和方法

1.1 样品

DNA 样品来源于 18 种动物：猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉、狗肉、兔肉、鸽子肉、火鸡肉、鸵鸟肉和鱼肉购自上海超市；鹅肉购自江苏扬州超市；驴肉购自河北石家庄超市；马肉、骆驼肉购自内蒙古呼和浩特超市；梅花鹿肉购于吉林长春；猫血在上海梵华宠物医院采集；鼠肉在复旦大学生命科学学院实验动物中心采集。

此外，200 份不同来源样品：各种肉制品 116 份、奶品 21 份，动物皮革毛发制品 33 份，动物源性成分作为添加剂的其他产品如奶茶、奶油、饲料、肉骨粉、乳清粉等 30 份。200 份样品购于全国各地，涵盖了肉制品市场新鲜生肉、超市鲜肉、培根烟熏肉、腊肉、火腿、香肠、烤摊肉类、火锅用肉，超市及淘宝袋装肉品、奶品、骨粉、饲料等，部分饲料（狗粮、猫粮）购于宠物医院，动物皮革毛发样品取自废旧皮革衣物。

1.2 试剂和仪器

1 http://news.qq.com/a/20130211/000255.htm
2 http://news.99.com.cn/jiankang/20110629/132692.htm
3 http://news.40777.cn/htmlnews/1466/1466704.htm
4 http://video.sina.com.cn/p/news/s/v/2013-05-03/073562377445.html

血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。2×HLingene PCR Master Mix 购自惠凌生物技术（上海）有限公司，AceQ™ qPCR Probe Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。DNA 分子量 Marker DL2000、电泳上样缓冲液等 PCR 生化反应试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。引物与探针由生工生物工程（上海）股份有限公司及德国 TIB MOLBIOL 合成。DNA 测序由上海睿迪生物科技有限公司完成。

Mx3000P 荧光定量 PCR 仪为 *Agilent* 公司产品，LightCycler 480II 荧光定量 PCR 仪为 *Roche* 公司产品， Veriti®96-Well ThermalCycler PCR 仪为 *Applied Biosystems* 公司产品，GENESPEED 416 型低速离心机为 *Gene* 公司产品，5424 型高速离心机为 *Eppendorf* 公司产品，FR－200A 全自动紫外与可见分析装置为上海复日科技有限公司产品，PowerPac™ Universal 电泳仪为 *BIO-RAD* 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 引物与探针的设计

从 GenBank 获取猪(*Sus scrofa*)、牛(*Bos taurus*)、鸡(*Gallus gallus*)、鸭(*Anas platyrhynchos*)、鹅(*Anser cygnoides domesticus*)的 *actb* 基因组 DNA(gDNA)序列，获取羊(*Ovis aries*)的 *prolactin receptor(PR)*基因组 DNA 序列，用在线多序列比对工具 MAFFT 对猪牛鸡鸭鹅 *actb*、羊 *PR* 基因序列进行全局比对，针对基因序列的差异位点设计用于定量 PCR 的引物和探针。引物和探针的设计由 DNAMAN 和在线工具 Primer 3 完成，并通过 NCBI 的序列比对工具 blastn、Primer-BLAST 和软件 Oligo 6.0 对选取的引物和探针的特异性及其他各项参数进行评价。（表1）

表 1 引物和荧光探针序列

Table 1-1 Primers and Taqman fluorescence probes (simplex)

Simplex	Sequence(5' to 3')
Pig-FP	GGAGTGTGTATCCCGTAGGTG
Pig-RP	CTGGGGACATGCAGAGAGTG
Pig-Probe	Cy5-TCTGACGTGACTCCCCGACCTGG-BHQ3
Bovine-FP	GTAGGTGCACAGTACGTTCTGAAG
Bovine-RP	GGCCAGACTGGGCACATG
Bovine-Probe	HEX-CGGCACACTCGGCTGTGTTCCTTGC-BHQ1
Sheep-FP	CAGACCAACATGCTTTTAAACC
Sheep-RP	AACTGTAGCCTTCTGACTCGC
Sheep-Probe	FAM-AGACTGGCGGGGAAGGAAAGAC-BHQ1
Chicken-FP	AAGTGCTGGCTGTGAGTTGG
Chicken-RP	CGCTCCGCTACCTAATTCCT
Chicken-Probe	FAM-CTGTACCTTAAGCCTGCTCAGACTCTGG-BHQ1
Duck-FP	CTGTGTCCTTTCTGTTTAGGGTC
Duck-RP	GCCTCCTGCTCTACTGCTG
Duck-Probe	HEX-TGTGTTCTACTGCAAAATCTTAACCTGTCC-BHQ1
Goose-FP	GCTGGGAGGAGAAAGGACT
G00se-RP	AGACCCTGTGTGCCCTCT
Goose-Probe	Cy5-TGGTAACTGAATCCCCATCTCTAGCTC-BHQ3

Table 1-2 Taqman fluorescence probes (hexa-plex)

Hexa-plex	Sequence(5' to 3')
Pig-Probe	Cy5-TCTGACGTGACTCCCCGACCTGG-BHQ3
Bovine-Probe	HEX-CGGCACACTCGGCTGTGTTCCTTGC-BHQ1
Sheep-Probe	FAM-AGACTGGCGGGGAAGGAAAGAC-BHQ1
Chicken-Probe	Cyan500-CTGTACCTTAAGCCTGCTCAGACTCTGG-BBQ
Duck-Probe	ROX-TGTGTTCTACTGCAAAATCTTAACCTGTCC-BHQ2
Goose-Probe	Red640-TGGTAACTGAATCCCCATCTCTAGCTC-BHQ2

1.3.2 样品 DNA 的提取

血液样品、肉制品、生皮、骨骼、动物源性饲料及饲料添加剂等组织样品依照天根血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒中的操作说明提取全基因组 DNA，鲜奶、酸奶参照田雨[3]、徐仙[4]、关潇[5]等方法提取 DNA，奶粉、奶茶等奶品参照 CTAB[6]法提取 DNA。皮革、毛发等 DNA 参照毛小慧[7]、柯振华[8]、刘颖[9]等方法提取。用 NanoDrop2000c 测定标准品原液 gDNA 浓度和纯度，并按 10 倍连续梯度稀释的方法依次稀释，即 10^0、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 等 5 个梯度以用于定量检测。

1.3.3 单一荧光 PCR 方法的建立

引物与探针分组配对，分别对猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅 6 种不同动物 DNA 进行检测，验证引物与探针的扩增有效性和特异性，建立分别检测猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅源性成分的单一荧光 PCR 方法。用 2%琼脂糖凝胶电泳检测目的产物条带，并将 DNA 模板分别为猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅的荧光定量 PCR 阳性产物送上海睿迪生物科技有限公司测序，分析比对序列，确定阳性扩增产物是否为目的片段。

1.3.4 单一荧光定量 PCR 方法反应体系和反应条件的优化

分别以猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅为研究对象, 反应体系设定为 50 µl, 筛选引物、探针最佳浓度以及最高扩增效率时的最适模板量。单一模板的 Real-time qPCR 反应体系：总体积 50µl，2 × AceQ^{TM} qPCR Probe Master Mix 25µl (终浓度 1 ×)，50 × ROX ReferenceDye 2 1µl (终浓度 1 ×)，上、下游引物终浓度在 0.1-1.0µM 范围内调整，Taqman 探针终浓度在 50-250nM 范围内调整，模板上样量不超过 5µl (每 50µl 体系以 1µg 为上限)，用灭菌 MilliQ 水补足。依据控制变量法每次试验只设一个变量，以 Ct 值、荧光增量、扩增效率、重复性和平台期等因素为考察依据，每个成分的浓度筛选重复实验 3 次，若结果稳定，可确定为最佳浓度值。根据引物与探针的退火温度，以优化好的反应体系摸索 PCR 最佳反应条件，在"95℃ 5~10min; 95℃ 10~15s，55~62℃ 15~45s，35~45 个循环" 范围内反复进行试验，每次试验只改变一个条件，每个反应条件重复试验 3 次，以 Ct 值、荧光增量、扩增效率、平台期和耗时等因素为考察依据，确定最佳反应条件。

1.3.5 单一荧光定量 PCR 方法的灵敏度实验

将提取的猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅来源的 DNA 模板原液进行梯度稀释，即 10^0、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 等 5 个梯度，以 1.3.4 优化好的反应体系和反应条件，分别进行猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅源性成分的荧光 PCR 检测、溶解曲线检测和 PCR 产物电泳检测。以上每组检测至少重复 3 次，每个检测设置 3 个平行试验，只有当每次重复检测和所有平行试验结果都一致时，才确定为物种该方法能检测到的最低模板量。

1.3.6 六重实时荧光 PCR 方法的建立及反应体系和反应条件的优化

6 对引物和 6 条荧光探针组合起来，模板采用相同浓度梯度混合的猪牛羊鸡鸭鹅 DNA 原液，参照方法 1.3.4 对六重实时荧光 PCR 反应体系和反应条件进行优化并完成溶解曲线检测。

1.3.7 六重实时荧光 PCR 方法的特异性实验

利用 1.3.6 建立好的六重实时荧光 PCR 方法分别对狗、兔、鼠、驴、马、骆驼、猫、鱼、鸽子、火鸡、鸵鸟和梅花鹿等其他 12 种动物 DNA 进行六重实时荧光 PCR 检测，并琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果，以评价检测方法的特异性。

1.3.8 六重实时荧光 PCR 方法的灵敏度实验

依照方法 1.3.5，利用六重实时荧光 PCR（6-plex qPCR）方法对猪牛羊鸡鸭鹅六种动物的 5 个（10^0、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}）混合梯度模板液进行检测，以确定 6-plex qPCR 方法能检测到的各物种最低模板量（灵敏度）。

1.3.9 样品检测

将 200 份不同来源的样品称重后剪碎，研磨至匀浆状（液体离心），用天根生物技术公司基因组 DNA 提取试剂盒及其他参考方法抽提 gDNA；采用六重实时荧光定量 PCR 方法对 200 份不同来源的 DNA 样品进行猪牛羊鸡鸭鹅源性成分检测，进一步验证六重荧光 PCR 方法的特异性；以之前制备好的猪牛羊鸡鸭鹅混合梯度模板液作为标准品绘制标准曲线，待测 DNA 分别对应标准曲线作绝对定量，以分析样品中是否含有猪牛羊鸡鸭鹅源性成分及其各自含量、比例。每份 DNA 样品的检测至少重复 2 次，每次均设置 2 个平行试验，只有当 2 次重复试验和所有平行试验结果都一致时，才确定该份 DNA 样品的检测结果，否则需重新检测。

2 结果

2.1 单一荧光 PCR 检测方法的建立（Mx3000P）

用试剂盒分别抽提猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅肉组织基因组 DNA，分别利用对应的引物和探针进行单重荧光定量 PCR 实验和交叉实验，2%琼脂糖凝胶电泳如图 1-1、1-2、1-3 所示：扩增产物条带单一，猪目的基因 *actb* 条带大小为 103bp，牛目的基因 *actb* 条带大小为 96bp，羊目的基因 *prolactin receptor* 条带大小为 90bp，鸡目的基因 *actb* 条带大小为 122bp，鸭目的基因 *actb* 条带大小为 142bp，鹅目的基因 *actb* 条带大小为 119bp，均与目标相符。交叉实验结果表明所建立的单重荧光定量 PCR 体系具有较高的特异性，在所考察的范围内，除了对种属内的 DNA 模板呈阳性外，对其他种属的 DNA 模板均显阴性。定量 PCR 扩增曲线及溶解曲线分析结果均与电泳结果吻合。

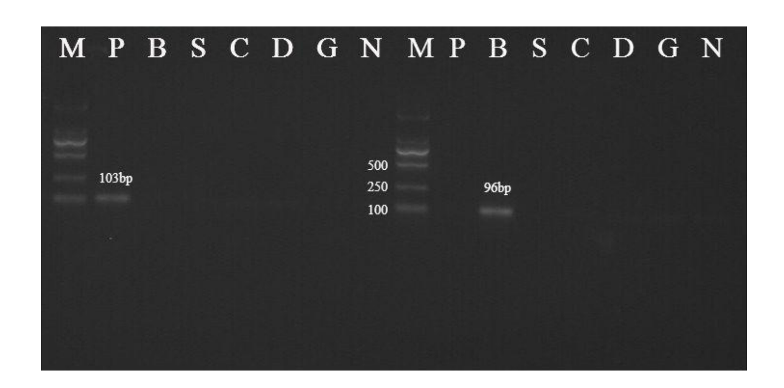


图 1-1 猪、牛目的片段单一荧光 PCR 扩增电泳检测结果及交叉实验

Fig. 1-1 Electrophoresis results of simplex qPCR products amplified (Pig & Bovine) and crossover experiments

M. DL2000 DNA Marker　Left side: primers and probe of pig; P. +Pig DNA; B. +Bovine DNA; S. +Sheep DNA; C. +Chicken DNA; D.+ Duck DNA; G. +Goose DNA; N. The negative control of pig.　Right side: primers and probe of bovine; P. +Pig DNA; B. +Bovine DNA; S. +Sheep DNA; C. +Chicken DNA; D.+ Duck DNA; G. +Goose DNA; N. The negative control of bovine.

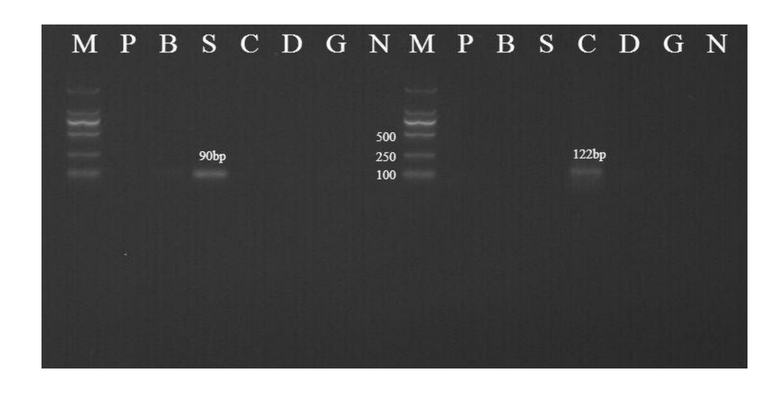


图 1-2 羊、鸡目的片段单一荧光 PCR 扩增电泳检测结果及交叉实验

Fig. 1-2 Electrophoresis results of simplex qPCR products amplified (Sheep & Chicken) and crossover experiments

M. DL2000 DNA Marker　Left side: primers and probe of sheep; P. +Pig DNA; B. +Bovine DNA; S. +Sheep DNA; C. +Chicken DNA; D.+ Duck DNA; G. +Goose DNA; N. The negative control of sheep.　Right side: primers and probe of chicken; P. +Pig DNA; B. +Bovine DNA; S. +Sheep DNA; C. +Chicken DNA; D.+ Duck DNA; G. +Goose DNA; N. The negative control of chicken.

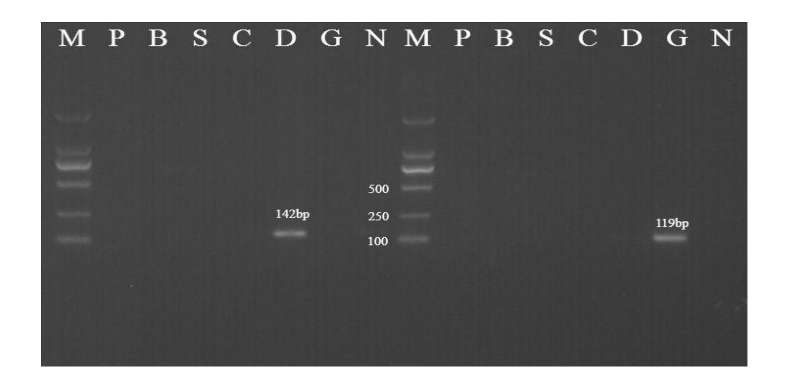


图 1-3 鸭、鹅目的片段单一荧光 PCR 扩增电泳检测结果及交叉实验

Fig. 1-3 Electrophoresis results of simplex qPCR products amplified (Duck & Goose) and crossover experiments

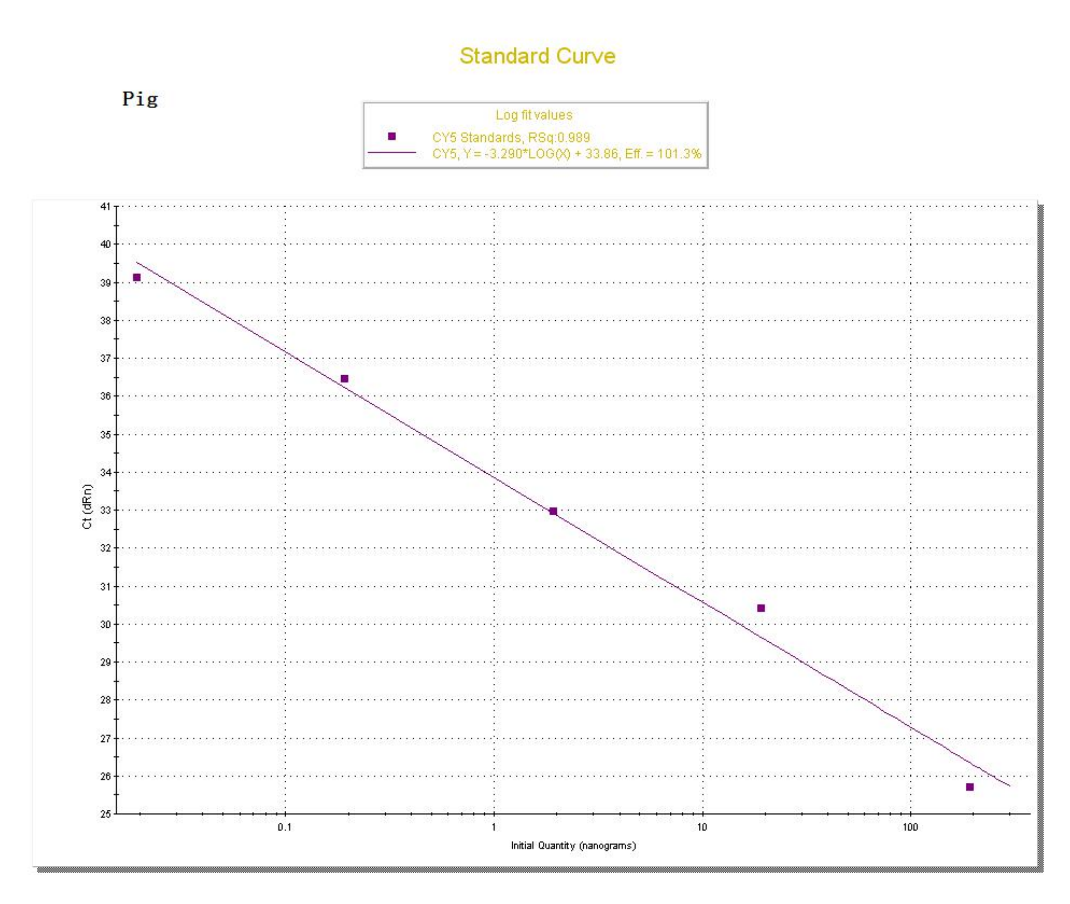
M. DL2000 DNA Marker　Left side: primers and probe of duck; P. +Pig DNA; B. +Bovine DNA; S. +Sheep DNA; C. +Chicken DNA; D.+ Duck DNA; G. +Goose DNA; N. The negative control of duck.　Right side: primers and probe of goose; P. +Pig DNA; B. +Bovine DNA; S. +Sheep DNA; C. +Chicken DNA; D.+ Duck DNA; G. +Goose DNA; N. The negative control of goose.

2.2 单一荧光 PCR 方法反应体系和反应条件的优化（Mx3000P）

经筛选优化，确定了单一荧光 PCR 的反应体系(50 μl)：总体积 50μl，2 × AceQTM qPCR Probe Master Mix 25μl (终浓度 1 ×)，50 × ROX ReferenceDye 2 1μl (终浓度 1 ×) ，上、下游引物各 1μl (终浓度 0.2μM)，Taqman 探针 0.5μl (终浓度 0.1μM)，模板上样量以每 50μl 体系不超过 1μg 为宜，无菌水补足。单一荧光 PCR 反应条件（两步法）：95℃预变性 5min，95℃变性 10s，60℃退火延伸 30s，反应循环数 40，信号采集设在延伸步骤。

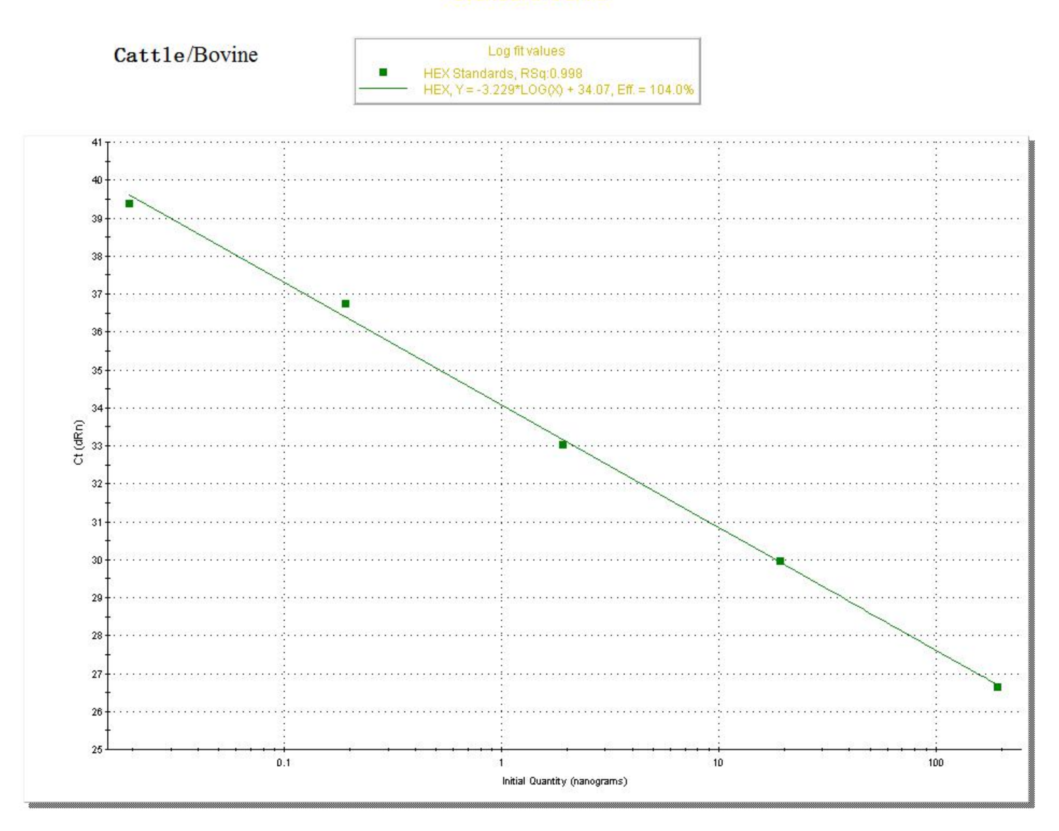
2.3 单一荧光 PCR 检测方法的灵敏度实验（Mx3000P）

将提取后稀释至同一浓度的猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅来源的 DNA 等 5 个梯度，以上述 1.3.4 的反应体系和反应条件，分别进行单物种 DNA 样品的荧光定量检测。将检测结果绘制成标准曲线，如图 2 所示。分析溶解曲线反映 PCR 有很好的特异性，无非特异扩增产物及引物二聚体。在 50μl 反应体系中，猪、牛、羊的 DNA 检测灵敏度均达到 0.02ng，鸡、鸭为 0.093ng，鹅为 0.04ng，大约相当于单个体细胞。在 10^0 到 10^{-4} 等 5 个梯度范围内均呈现很好的线性关系。凝胶电泳检测扩增条带的结果与溶解曲线分析结果一致，条带的亮度变化清楚反映了模板 DNA 浓度的变化梯度。测序验证扩增条带均与数据库中数据一致，为目的基因片段。

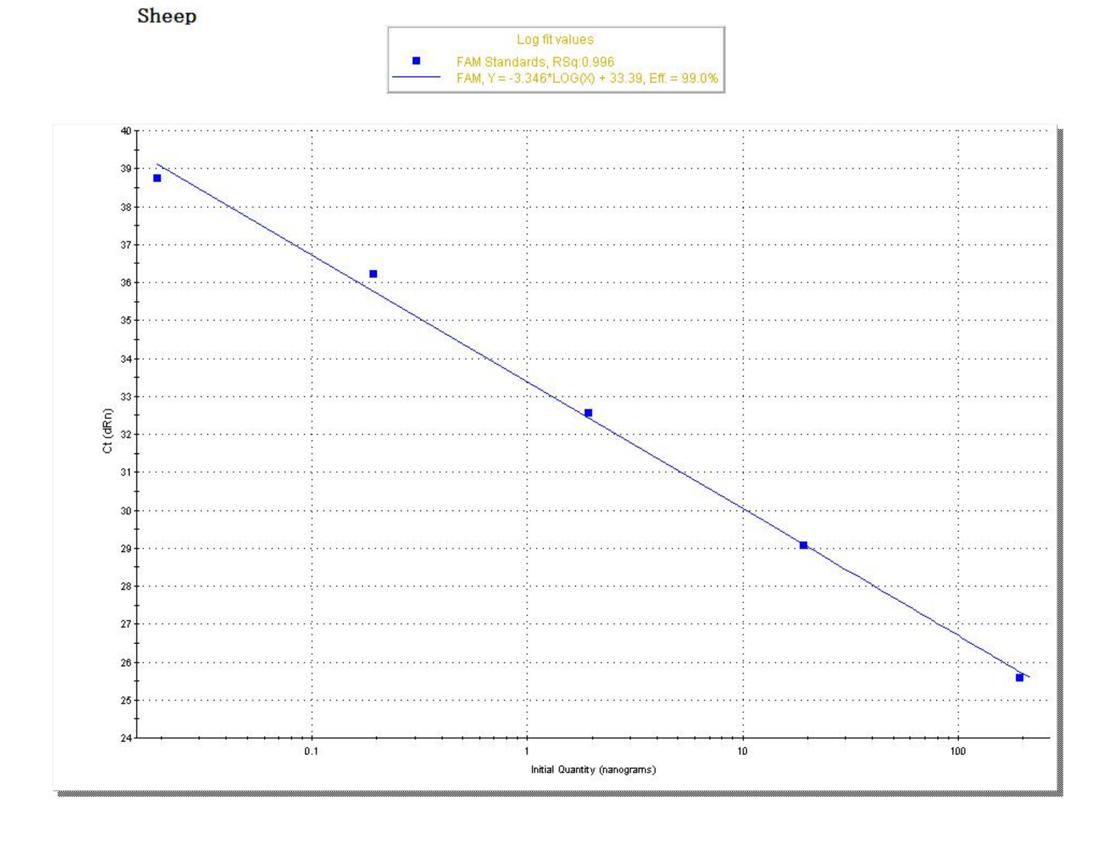


(a)

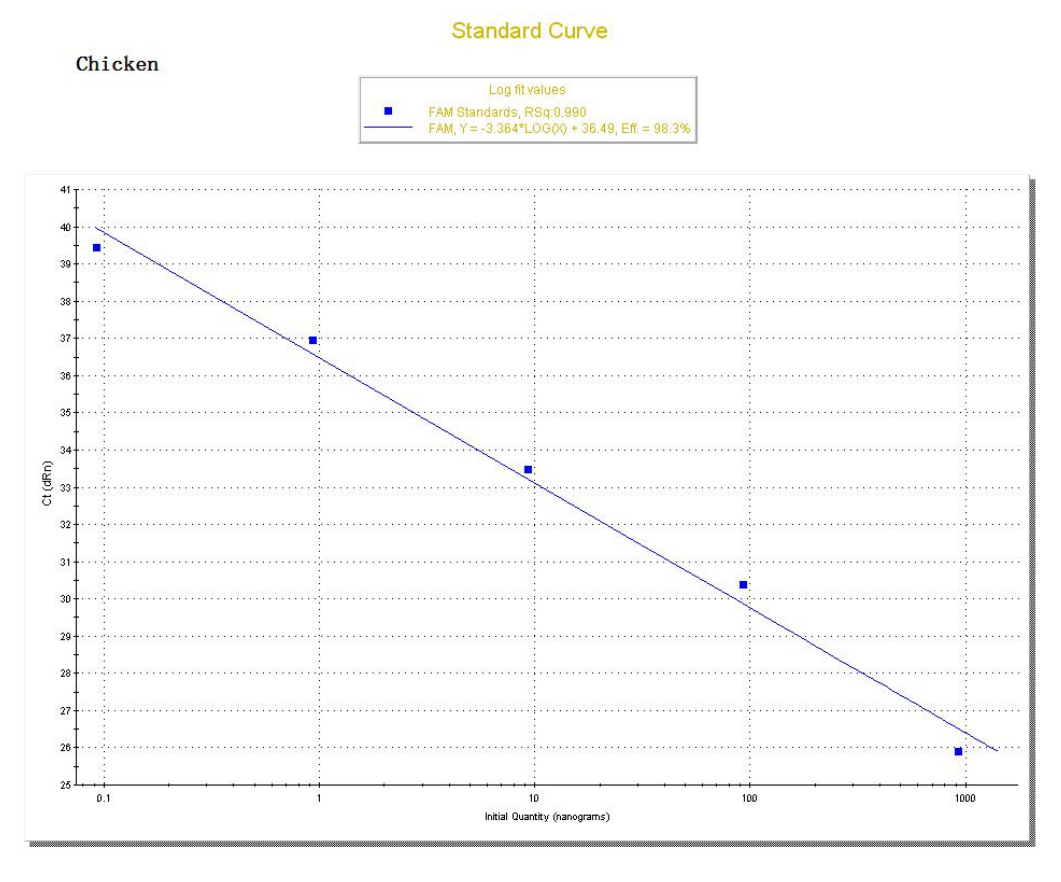

Standard Curve


Cattle/Bovine
Log fit values
HEX Standards, RSq:0.998
HEX, Y = -3.229*LOG(X) + 34.07, Eff. = 104.0%
Ct (dRn)
Initial Quantity (nanograms)

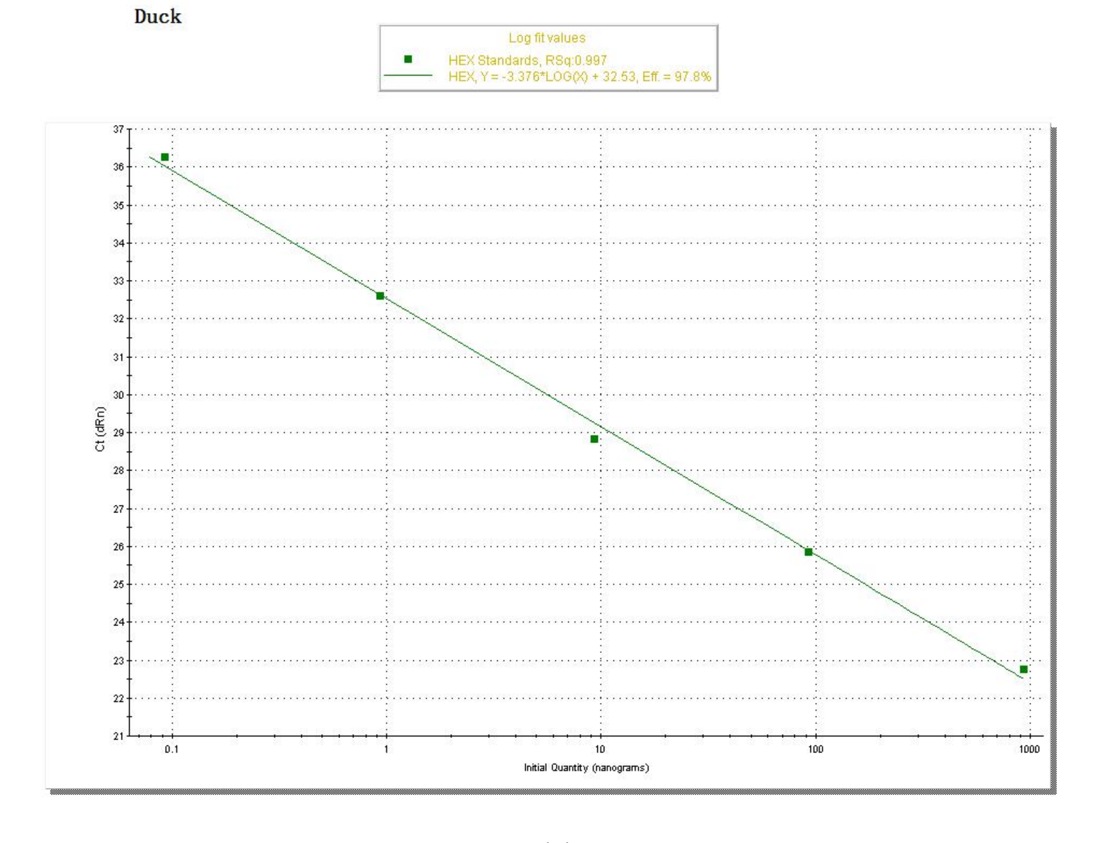
(b)


Standard Curve
Sheep
Log fit values
FAM Standards, RSq:0.996
FAM, Y = -3.346*LOG(X) + 33.39, Eff. = 99.0%
Ct (dRn)
Initial Quantity (nanograms)

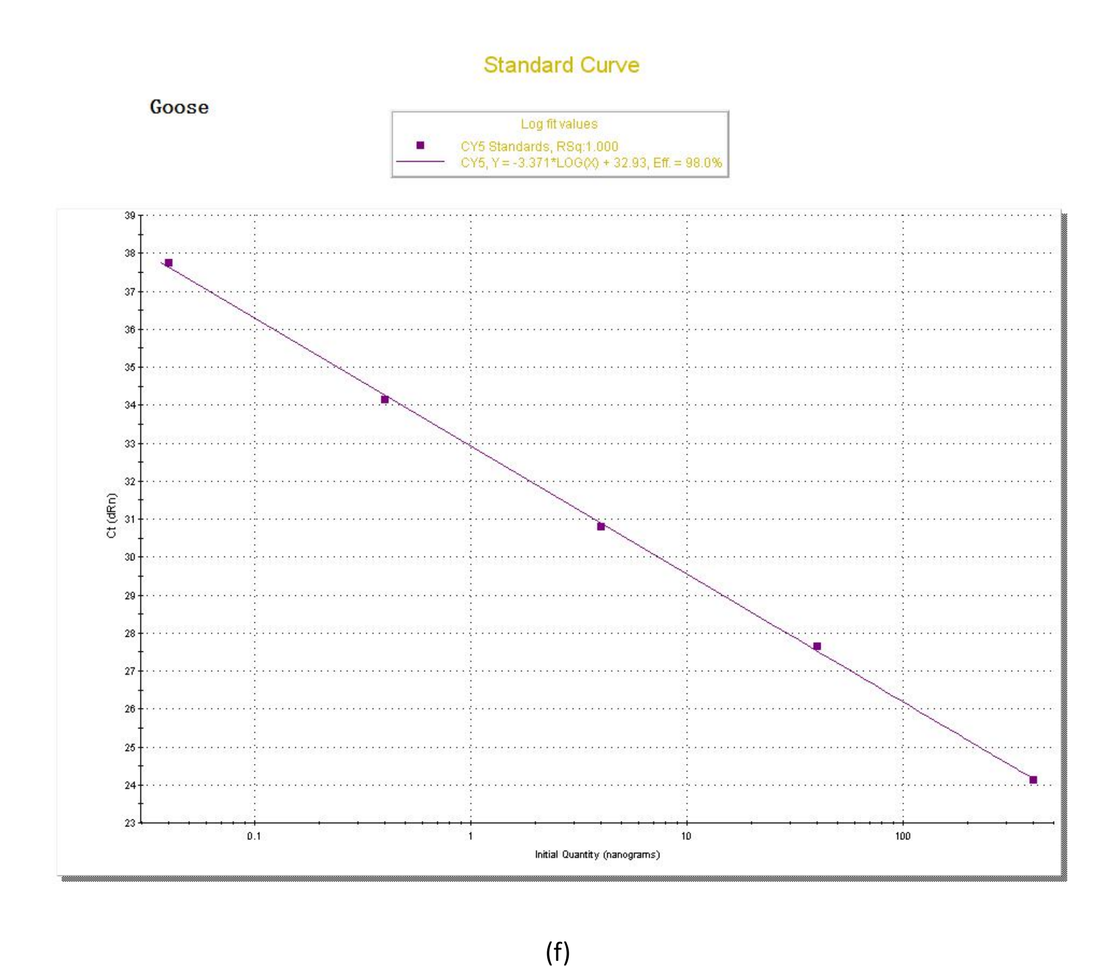
(c)


Standard Curve
Chicken
Log fit values
FAM Standards, RSq:0.990
FAM, Y = -3.364*LOG(X) + 36.49, Eff. = 98.3%
Ct (dRn)
Initial Quantity (nanograms)

(d)


Standard Curve
Duck
Log fit values
HEX Standards, RSq:0.997
HEX, Y = -3.376*LOG(X) + 32.53, Eff. = 97.8%
Ct (dRn)
Initial Quantity (nanograms)

(e)



(f)

图 2 单一荧光定量 PCR 检测方法的灵敏度实验结果

Fig. 2 Results of sensitivity tests of simplex fluorescent real-time PCR

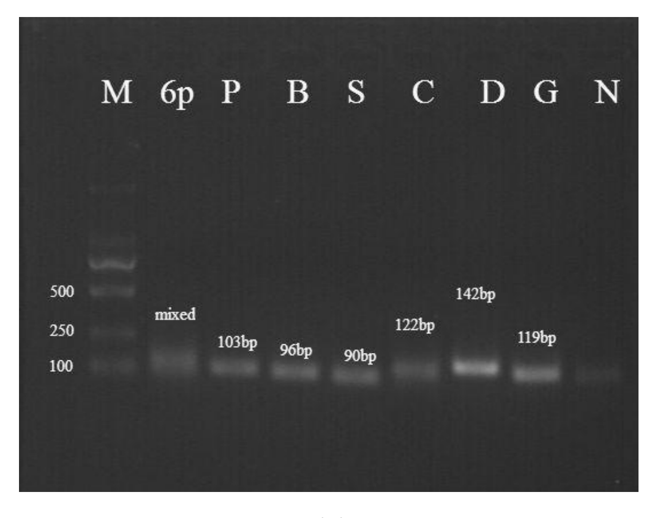
(a) The standard curve of the actb gene of pig (singled by FAM) (b) The standard curve of the actb gene of bovine (singled by HEX) (c) The standard curve of the prolactin receptor gene of sheep (singled by Cy5) (d) The standard curve of the actb gene of chicken (singled by FAM) (e) The standard curve of the actb gene of duck (singled by HEX) (f) The standard curve of the actb gene of goose (singled by Cy5)

2.4 六重实时荧光 PCR 方法的建立及反应体系和反应条件的优化（LightCycler 480II）

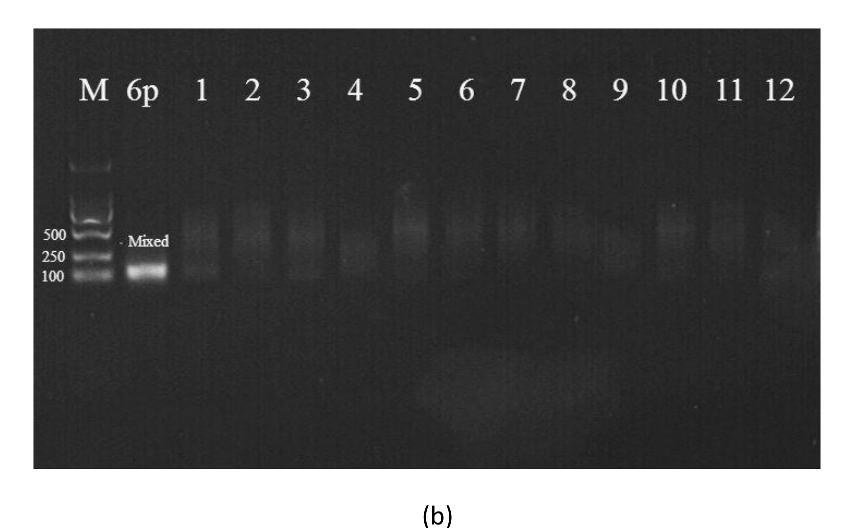
经筛选优化，确定 50 µl 反应体系中各成分分别为：2 × AceQTM qPCR Probe Master Mix 25µl (终浓度 1 ×)，上、下游引物各 0.4µl (终浓度 0.08µM)，Taqman 探针 0.2µl(终浓度 0.04µM)，各物种模板上样量每 50µl 体系不超过 160ng 为宜，无菌水补足。六重实时荧光 PCR 反应条件（两步法）：95℃预变性 5min，95℃变性 10s，60℃退火延伸 30s，反应循环数 40，信号采集设在延伸步骤。

2.5 六重实时荧光 PCR 方法的特异性实验

利用上述 1.3.6 已建立的六重实时荧光 PCR 方法进行特异性试验，结果显示，对狗、兔、鼠、驴、马、骆驼、猫、鱼、鸽子、火鸡、鸵鸟和梅花鹿等 12 种动物 DNA 无特异性扩增，而猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅均可扩增出预期大小的条带（图 3），经测序后确定是目的基因序列，表明该方法有良好的特异性。



(a)



(b)

图 3 六重实时荧光 PCR 检测方法的特异性实验结果

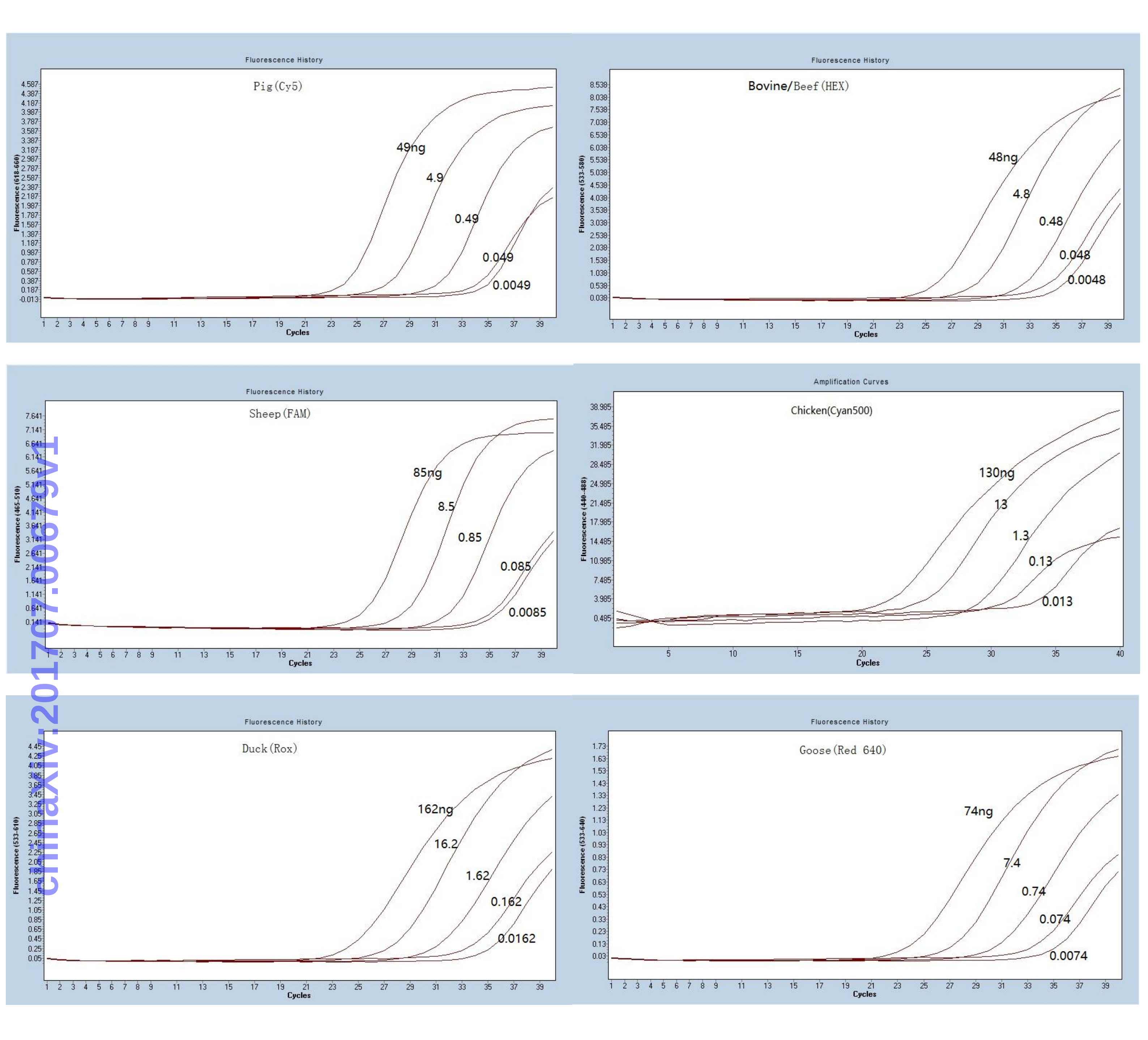
Fig. 3 Specificity results of hexa-plex fluorescent real-time PCR

(a) M. DL2000 DNA marker; 6p. 6-plex qPCR products of pig & bovine & sheep & chicken & duck & goose; P. 6-plex qPCR product of pig; B. 6-plex qPCR product of bovine; S. 6-plex qPCR product of sheep; C. 6-plex qPCR product of chicken; D. 6-plex qPCR product of duck; G. 6-plex qPCR product of goose; N. Negative control.

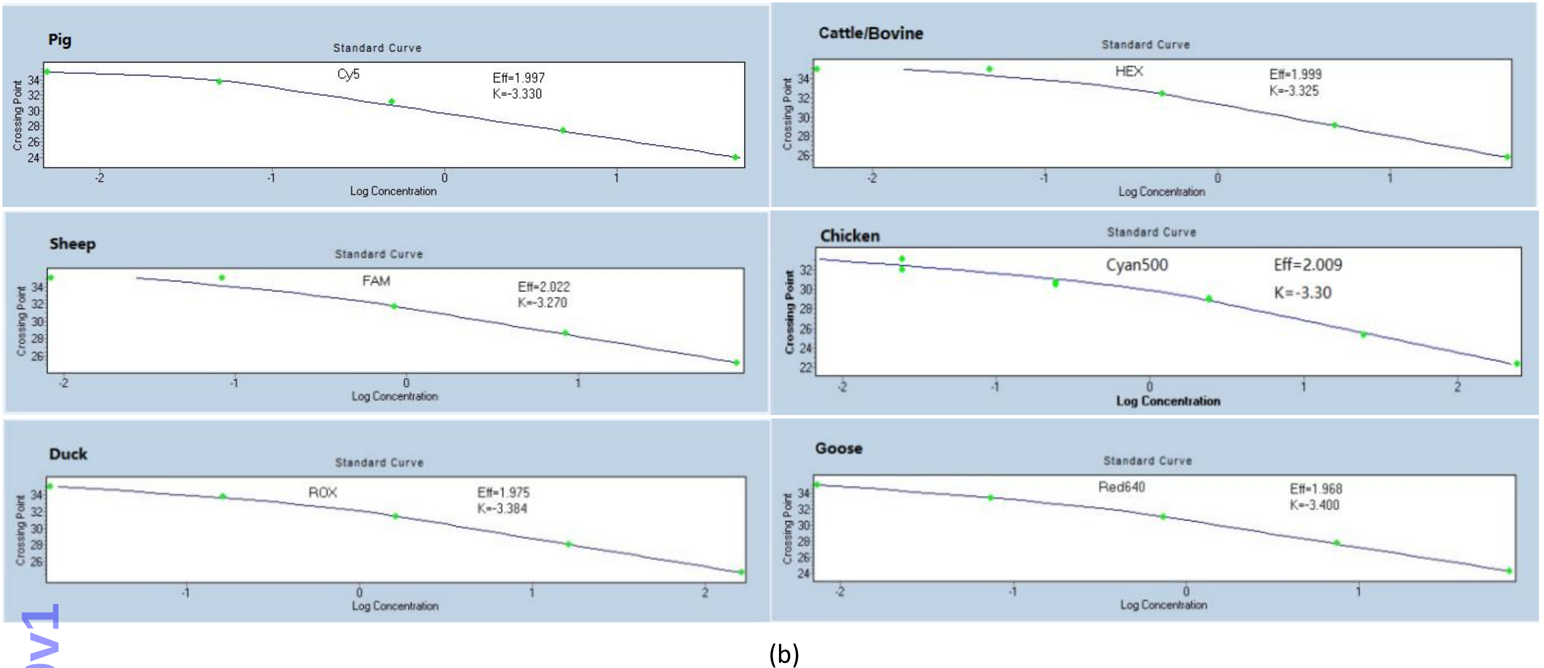
(b) M. DL2000 DNA marker; 6p. 6-plex qPCR products of pig & bovine & sheep & chicken & duck & goose; 1. 6-plex qPCR product of dog; 2. 6-plex qPCR product of rabbit; 3. 6-plex qPCR product of rat; 4. 6-plex qPCR product of donkey; 5. 6-plex qPCR product of horse; 6. 6-plex qPCR product of camel; 7. 6-plex qPCR product of cat; 8. 6-plex qPCR product of carp; 9. 6-plex qPCR product of pigeon; 10. 6-plex qPCR product of turkey; 11. 6-plex qPCR product of ostrich; 12. 6-plex qPCR product of sika deer.

2.6 六重实时荧光 PCR 方法的灵敏度实验

按方法 1.3.5 和 1.3.8，对 10 倍梯度稀释的模板进行六重实时荧光定量 PCR 灵敏度实验，经多次试验后，确定六重实时荧光 PCR 方法对猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅源性成分的最低检测限都至少能达到 10^{-3} 模板梯度，50μl 体系能检测到猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅的最低 DNA 模板量分别为 0.049ng、0.048ng、0.085ng、0.13ng、0.162ng、0.074ng（图 4）。


Fluorescence History
Pig (Cy5)
49ng
4.9
0.49
0.049
0.0049
Fluorescence (618-660)
Cycles
Bovine/Beef (HEX)
48ng
4.8
0.48
0.048
0.0048
Fluorescence (533-580)
Sheep (FAM)
85ng
8.5
0.85
0.085
0.0085
Fluorescence (465-510)
Amplification Curves
Chicken(Cyan500)
130ng
13
1.3
0.13
0.013
Fluorescence (440-488)
Duck (Rox)
162ng
16.2
1.62
0.162
0.0162
Fluorescence (533-610)
Goose (Red 640)
74ng
7.4
0.74
0.074
0.0074
Fluorescence (533-640)

(a)



(b)

图 4 六重实时荧光定量 PCR 检测方法的灵敏度实验结果

Fig. 4 Results of sensitivity tests of hexa-plex fluorescent real-time PCR

(a) The amplification curves of pig(Cy5) & bovine(HEX) & sheep(FAM) & chicken(Cyan500) & duck(ROX) & goose(Red640) (b) The standard curves of pig(Cy5) & bovine(HEX) & sheep(FAM) & chicken(Cyan500) & duck(ROX) & goose(Red640)

2.7 样品检测结果

按方法 1.3.8，采用六重实时荧光 PCR 方法分别对收集的 200 份不同来源 DNA 样品进行猪牛羊鸡鸭鹅源性成分检测。结果表明，六重实时荧光 PCR 方法具有良好的特异性和灵敏度，21 份奶品中检测出 3 份奶品掺假，33 份皮毛 7 份与商品名不符，116 份肉制品 19 份掺假使杂，其他产品 30 份中 8 份与商品标识的成分不完全相符。具体检测结果见表 2。

表 2 六重实时荧光 PCR 方法的样品检测结果

Table 2 results detected by hexa-plex fluorescent real-time PCR

Kinds of animal source	Meat	Milk	Pelt	Others	Total
Pig only-derived	23	0	0	8	31
Bovine only-derived	15	12	8+1	6	42
Sheep only-derived	9	5	6	2	22
P+B-derived	2	0	0	0	2
P+S-derived	7	0	0	1	8
B+S-derived	3	3	0	2	8
P+B+S-derived	3	0	0	0	3
Chicken only-derived	15	0	0	4	19
Duck only-derived	11	0	8	2	21
Goose only-derived	7	0	4	0	11
C+D-derived	2	0	0	0	2
D+G-derived	2	0	1	0	3
Negative	17（其他肉）	1（马奶）	5	5	28
Total	116	21	33	30	200

3 讨论

本研究建立了用于检测市场最常见 6 种肉制品的六重实时荧光定量 PCR 方法，分别针对猪、牛、鸡、鸭、鹅的*β-actin* 基因、绵羊的 *prolactin receptor* 基因的保守区域设计了 6 对特异性的引物和 6 条特异性的荧光探针，可一次同时扩增出 103、96、90、122、142、119bp 的条带，经测序与目的序列相符。虽然由于目的序列间大小差异不大琼脂糖凝胶电泳不能清楚地将条带分开（图 3），但 real-time qPCR 很好的弥补了这一缺陷，通过观察溶解曲线及荧光扩增曲线就能判断某种成分是否存在，相比传统完全依赖跑胶、测序的多重 PCR 方法[10]有明显的优势；除此之外本方法还能定量检测，通过制好的标准品绘制标准曲线，待测 DNA 分别对应标准曲线作绝对定量，可快速分析出样品中是否含有猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅源性成分及其各自的含量、比例。

与普通 PCR 相比，多重荧光定量 PCR 除了要求不同引物对能在同一反应体系中对多个不同模板序列进行特异性扩增以外，还要求添加的不同荧光报告基团标记的多个探针能特异地结合靶序列，准确地对各靶序列进行定量。本研究共设计了 6 条荧光探针，按照荧光基团 Reporter 波长大小依次是 Cyan500、FAM、HEX、ROX、Red640 和 Cy5，并双标 BBQ、BHQ1、BHQ1、BHQ2、BHQ2 和 BHQ3 作为 Quencher。由于相邻通道的荧光可能部分存在 overlap，所以本实验还做了颜色补偿 color compensation test 以对数据进行校正。本研究中用到的荧光定量 PCR 仪 LightCycler 480/LightCycler 480II 为 *Roche* 公司产品，是现今仅少数同时支持六荧光通道检测的仪器；而六通道中第一通道对荧光波长要求太高，Excitation/Emision 为 440nm/488nm，很少染料能满足要求，本室从德国合成 LC480 第一通道专用 Cyan500 荧光探针，真正实现了一次 PCR 反应同时检测六种动物源性成分的目标，且通过试验验证该方法特异性好，灵敏度高，检测核酸含量可达 pg 级。本研究采用 AceQTM qPCR Probe Master Mix 代替传统的 PCR 反应体系（dNTP、Taq 酶、10 × PCR buffer 组合体系），减少了加样的繁琐步骤以及可能产生的污染，同时提高了反应的灵敏度。

利用本研究建立的六重实时荧光 PCR 方法对收集来自全国各地 200 份不同的样品进行猪牛羊鸡鸭鹅源性成分检测，结果显示：购买的 21 份奶品中 12 份牛奶产品均只检测到牛源性成分，8 份羊奶产品均含有羊源性成分，但其中 1 份鲜羊奶、2 份羊奶粉中同时检测到牛源性成分，酸马奶未发现任何牛羊源性成分。收集的 33 份皮革毛皮等样品，经检测 10 份牛皮产品（皮鞋、皮带、皮包、皮衣夹克）只有 8 份牛皮，2 份不明；10 份羊皮毛（羊皮鞋、皮包、羊毛大衣羊毛衫）6 份检测到羊源性成分，1 份（皮包）为牛源性成分，与商品名不符，其余 3 份不明；8 份鸭绒产品（鸭绒被、鸭绒枕、鸭绒服）均只含鸭源性成分；5 份鹅绒产品（鹅绒被、鹅绒服）均含鹅源性成分，但有一件羽绒服同时检测到了鸭源性成分。116 份肉制品 2 份牛肉中掺入猪肉，7 份羊肉中掺入猪肉，3 份羊肉中掺入牛肉，3 份羊肉火锅中同时检测到猪牛羊三种肉；2 份鸭肉中发现鸡肉，2 份鹅肉中掺入鸭肉，17 份其他种肉制品（驴肉火烧、阿胶、鱼丸、狗肉、兔肉等）不含上述 6 种动物成分，但也不排除掺杂其他肉类。30 份其他产品主要为奶茶、奶油、饲料、肉骨粉等，具体检测结果见表 2。

上述检测结果表明，目前国内肉制品市场上依然存在着严重的掺假使杂现象，主要为低价肉品冒充高价肉类，如猪肉冒充牛羊肉、鸡鸭肉冒充鹅肉、鸭绒冒充鹅绒等，而火锅用羊肉卷更是羊肉掺假的重灾区。利用本研究建立的六重实时荧光定量 PCR 方法对肉制品等进行检测，不仅可快速灵敏有效地鉴别猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅源性成分，杜绝不法行为，还能提高执法的科学性和效率，加快检疫检验通关速度，切实维护消费者的利益与安全。

参考文献

[1] Dooley J J, Paine K E, Garrett S D, et al. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays[J]. Meat Science, 2004, 68(3): 431-438.

[2] 曾少灵，秦智锋，阮周曦，等. 多重实时荧光 PCR 检测牛、山羊和绵羊源性成分[J]. 生物工程学报，2009，25(1)：139-146

Shaoling Zeng, Zhifeng Qin, Zhouxi Ruan, et al． Multiplex fluorescent real-time PCR detection of bovine, goat and sheep derived materials in animal products. Chin J Biotech 2009, 25(1): 139-146

[3] 田雨. 从牛奶中分离 DNA 方法的建立[J]. 乳业科学与技术，2006, 29(3)：112-113.

Tian Yu. Establishment of Method of SeParating DNA from Milk. Journal of Dairy Science and Technology. 2006, 29(3): 112-113.

[4] 徐仙，陈沁，雍克岚，等. PCR 方法在区分牛奶牧场来源中的应用[J]. 食品科技，2008，33(12)：258-261.

XU Xian, CHEN Qin, YONG Ke-lan, et al. Application of PCR in analyzing farm sources. Food Science and Technology. 2008, 33(12): 258-261.

[5] 关潇，蔡琴，陈沁. 基于α-乳白蛋白基因序列的牛奶过敏原 PCR 检测. 乳业科学与技术，2013，36(4)：19-22.

GUAN Xiao, CAI Qin, CHEN Qin. Establishment of PCR Method Based on the α-Lactalbumin-Encoding Gene for Detecting Milk Allergens. Journal of Dairy Science and Technology. 2013, 36(4): 19-22.

[6] 张文举，许庆金，邓志瑞，等. 芝麻过敏原 PCR 检测方法[J]. 食品与机械，2012，28(2)：52-55.

ZHANG Wen-ju, XU Qing-jin, DENG Zhi-rui, et al. Establishment of PCR method for detecting sesame allergen. Food & Machinery. 2012, 28(2): 52-55.

[7] 毛小慧，刘敏. 天然皮革定性 PCR 检测方法的研究[J]. 中国皮革，2014，43(14)：97－99，106.

Mao Xiaohui, Liu Min. Research on the PCR Detective Method for Nature Leather Qualitation. China Leather, 2014, 43(14): 97－99, 106.

[8] 柯振华，罗海英，陈筱婷，等. 牛皮革 PCR 鉴别方法研究[J]. 皮革科学与工程，2013，23(1)：32－36，42.

KE Zhen－Hua, LUO Hai－Ying, CHEN Xiao－Ting, et al. Identification of Bovine Leather Using PCR Technology. Leather Science and Engineering, 2013, 23(1): 32－36, 42.

[9] 刘颖，孙蓓，马彦，等. 从一根毛发中分别提取 nDNA 和 mtDNA 的简易方法[J]. 天津医药，2008，36(7)：510-512.

LIU Ying, SUN Bei, MA Yan, et al. The Study of the DNA Extraction Procedure from a Single Hair. Tianjin Medical Journal, 2008, 36(7): 510-512.

[10] 罗宁，王冬冬，杨宗统，等. 猪 6 种常见病毒多重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 动物医学进展，2016，37(12)：1-6

LUO Ning, WANG Dong-dong, YANG Zong-tong, et al. Establishment and Application of Multiplex PCR for Detecting Six Kinds of Swine Viruses. Progress in Veterinary Medicine. 2016, 37(12): 1-6

Establishment and Application of Multiplex fluorescent real-time PCR for Detecting Six Kinds of animal derived materials*

FU Li-wen[1]，ZHANG Yu[2]，YI Han[2]，LI Xue[3]，ZHU Nai-shuo**

(Lab of Molecular Immunology，State Key Lab of Genetic Engineering，Institute of Biomedical Science，School of Life Science，Fudan University，Shanghai 200438，China)

Abstract Objective: To establish a highly efficient method for simutaneously detecting pig, bovine, sheep, chicken, duck and goose derived materials in animal products by use of the multiplex fluorescent real-time quantitative PCR(qPCR). Methods: The species-specific primers and probes for detection of beta-actin (actb) genes of pig, bovine, chicken, duck and goose, and the prolactin receptor gene of sheep in multiplex fluorescent real-time quantitative PCR assay were designed. Total DNA as templates were extracted respectively from the six kinds of animal materials. The specificity and sensitivity of these primer pairs and probes were separately confirmed using simplex real-time qPCR analysis. Six pairs of primers and six fluorescent probes were mixed up with the above 6 kinds of animal templates. And the most effective reaction system and condition for multiplex(hexa-plex) qPCR method were obtained experimentlly after lots of tests and optimization. The specificity, sensitivity and accuracy of this assay were evaluated. Results: The limits of detection (LOD) of the assay were 0.049ng, 0.048ng, 0.085ng, 0.13ng, 0.162ng, 0.074ng DNA for pig, bovine, sheep, chicken, duck and goose, respectively (50μl qPCR reaction system), and the amplification results of other animals were all negative. A total of 200 specimens tested by the multiplex qPCR method one more showed its accuracy, precision and high efficiency. Conclusions: The study showed that the developed multiplex fluorescent real-time quantitative PCR method was a rapid, specific, sensitive and efficacious detection assay for pig, bovine, sheep, chicken, duck and goose derived materials in animal products, and was applicable to identifications in feed stuff, meat, milk, pelt and grease, etc.

Key words Genomic conserved genes Multiplex fluorescent real-time quantitative PCR pig, bovine, sheep, chicken, duck and goose derived materials

Supported by: National Science and Technology Major Project(2012ZX10002006-002-003), National Natural Science Foundation of China(30571650, 31370927), National High Technology Research and Development Program of China(2011AA02A114), Natural Science Foundation of Shanghai(13431900602).

Corresponding author: ZHU Nai-shuo; E-mail: nzhu@fudan.edu.cn